重离子辐射诱导的黑色素瘤细胞衰老及促凋亡药物 ABT-263 对衰老细胞的清除作用

张通珊[1,2]，赵奕飞[3]，华君瑞[1]，何进鹏[1,2#]，王菊芳[1,2#]

(1. 中国科学院近代物理研究所 甘肃省空间辐射生物学重点实验室，兰州 730000；

2. 中国科学院大学，北京 100049；

3. 兰州大学基础医学院，兰州 730000)

摘要：探究了重离子辐射诱导黑色素瘤细胞衰老的生物学效应及促凋亡药物 ABT-263 对衰老细胞的清除作用。利用兰州重离子研究装置 HIRFL 提供的碳离子束照射黑色素瘤 A375 和 92-1 细胞，通过衰老相关β-半乳糖苷酶染色、酶联免疫测定、流式细胞术等方法检测了细胞衰老和凋亡，利用 CCK-8 检测细胞活力，碘化丙啶染色检测细胞死亡。结果显示，在 10 Gy 碳离子照射后的 120 h，两种细胞的死亡率均不超过 10%，而 80%以上的 A375 细胞和 60%以上的 92-1 细胞呈现出明显的膨大、扁平化、衰老相关β-半乳糖苷酶染色阳性等典型的衰老表型，并伴有 GDF15 表达和外泌水平提高；照射后加入 ABT-263 可显著促进衰老的细胞发生死亡，照射后 120 h 死亡率分别提高至 53%和 71%。研究结果进一步明确了重离子辐射诱导黑色素瘤细胞衰老的效应及 ABT-263 对衰老细胞的清除潜力。

关键词： 重离子；细胞衰老；ABT-263；细胞凋亡；GDF15

中图分类号：**Q691**　　**文献标志码**：**A**　　**doi:**

1 引言

黑色素瘤源于表皮基底层的黑色素细胞，多发于皮肤和黏膜等部位，是一种对放疗极不敏感的高度恶性肿瘤[1]。衰老是细胞停止分裂增殖并永久性地退出细胞周期的特殊状态，因而诱导肿瘤细胞发生衰老能够有效抑制肿瘤的生长。p53 基因野生型的肿瘤细胞被电离辐射处理后更倾向于发生衰老而非程序性死亡，但衰老细胞具有逃离免疫细胞清除和抗凋亡能力，因而能够长期存在并增加了肿瘤复发的隐患和转移的风险[2]。同时，衰老的肿瘤细胞仍具有代谢活性，分泌生长因子、趋化因子、炎症因子和细胞外基质蛋白酶等多种类型细胞因子，

收稿日期：yyyy-mm-dd；**修改日期**：yyyy-mm-dd

基金项目：国家自然科学基金项目(12175289，12375355)；甘肃省科技计划项目(20JR5RA555，145RTSA012，24JRRA952)；中国科学院青年创新促进会项目(2021415)

作者简介：张通珊(1996-)，男(土族)，甘肃临夏人，博士研究生，专业为生物物理学；E-mail：zhangtongshan@impcas.ac.cn

通信作者：何进鹏，E-mail：hejp03@impcas.ac.cn；王菊芳，E-mail：jufangwang@impcas.ac.cn

形成衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）[3]。SASP 因子可能会加速旁细胞衰老进程继而放大衰老效应，也能够引发炎症、诱导血管生成、促进肿瘤细胞转移和复发[4]。生长分化因子 15（growth differentiation factor 15，GDF15）是转化生长因子β（TGF-β）超家族成员，具有抗凋亡、抗炎、调节细胞应激反应等作用[5]。电离辐射可以刺激肿瘤细胞的 GDF15 表达和分泌[6-7]，使其参与调节肿瘤细胞衰老及辐射抵抗[8-9]。因此，理想的治疗方案是放疗后再利用衰老细胞清除剂 (senolytics) 如槲皮素 (quercetin) 、ABT-263（navitoclax）、白藜芦醇（resveratrol）、二甲双胍（metformin）等将衰老细胞清除，以确保已获得的治疗效果[9-12]。

重离子在射程末端形成 Bragg 峰的物理特性, 使其在肿瘤的临床治疗中能够使照射能量最大程度地聚焦到肿瘤部位，并有效保护周围的健康组织；重离子还具有横向散射小、相对生物学效应高的特点，能够进一步减少正常组织的放射损伤，在治疗深层和对传统放疗抗拒的肿瘤中表现出非常明显的优势。我们的前期研究结果显示，重离子辐射相较于 X 射线诱发肿瘤细胞衰老的剂量阈值更低、效率更高[13]。ABT-263 是针对在细胞凋亡中起关键作用的 BCL-2 家族蛋白开发的小分子特异抑制剂，它能使线粒体外膜通透性发生改变从而激活细胞凋亡 [14-17]。衰老细胞中 BCL-2 家族蛋白的表达水平往往会升高，并对 BCL-2 抑制剂表现出敏感[18]。在临床研究中，ABT-263 能够激活小细胞肺癌、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤等肿瘤细胞的凋亡信号通路，并进一步增强化疗药物的治疗效果[19-21]。我们实验室的前期研究发现, 槲皮素处理辐照后发生衰老的黑色素瘤 92-1 细胞可以启动凋亡程序[22]。鉴于 ABT-263 在诱导细胞凋亡方面的突出能力，非常有必要进一步探究它对重离子辐射后发生衰老的黑色素瘤细胞的清除作用, 为未来的重离子辐射联合衰老细胞清除剂治疗方案提供基础数据。

Molecular formula: $C_{47}H_{55}ClF_3N_5O_6S_3$; Molecular weight: 974.61 g/mol

图 1　ABT-263 化学结构

2 材料与方法

2.1 实验材料

人眼基底脉络膜黑色素瘤 92-1 细胞、人皮肤黑色素瘤 A375 细胞均由本实验室保种。RPMI-1640、DMEM 培养基（Gibco 公司，美国）；胎牛血清（BI 公司，以色列）；碘化丙啶（propidium iodide，PI）、总蛋白提取试剂（中性细胞裂解液 RIPA）、衰老相关β-半乳糖苷酶（senescence associated β-galactosidase，SA-β-Gal）检测试剂盒（上海碧云天公司，中国）；细胞因子抗体芯片（RayBiotech 公司，美国）；p53、p21、GDF15 及β-actin 蛋白一抗 (Abcam 公司, 英国)；蛋白二抗 (北京中杉金桥公司, 中国)；ECL 发光试剂盒 (Milipore 公司，美国）；Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（BD Biosciences 公司，美国)；酶联免疫测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（武汉伊莱瑞特公司，中国）；Cell counting kit-8（CCK-8）试剂盒（Dojindo 公司，日本）；ABT-263（Selleckchem 公司，美国）。

2.2 细胞培养及照射条件

A375 细胞使用 DMEM（10%胎牛血清）培养，92-1 细胞使用 RPMI-1640（10%胎牛血清）培养。重离子照射在兰州重离子加速器（Heavy Ion Research Facility in Lanzhou，HIRFL）浅层肿瘤治疗终端进行，束流：$^{12}C^{6+}$离子束，能量：80 MeV/u，传能线密度（linear energy transfer，LET）：50 keV/μm，剂量率如表 1 所示，单次照射剂量：10 Gy；X 射线照射在 PXi Precision X-RAY（225 kV 恒压）装置进行，电流：13.3 mA，剂量率：2 Gy/min，单次照射剂量：10 Gy。所有样品照射都在室温下进行。

表 1 重离子辐照剂量及剂量率记录表（部分）

样品序号	样品名称	目标剂量（Gy）	目标剂量率（Gy/min）	剂量率下限	剂量率上限	实际剂量（Gy）	实际剂量率（Gy/min）
1	细胞	10	2	1	5	10.038377	3.144356
2	细胞	10	2	1	5	10.019116	2.409112
3	细胞	10	2	1	5	10.016071	2.810507
4	细胞	10	2	1	5	10.056091	2.975251
5	细胞	10	2	1	5	10.029943	2.640387
6	细胞	10	2	1	5	10.007588	2.723613
7	细胞	10	2	1	5	10.027333	2.764355
8	细胞	10	2	1	5	10.018028	2.563342
9	细胞	10	2	1	5	10.021001	2.294292
10	细胞	10	2	1	5	10.018681	1.893663

2.3 PI 染色检测细胞死亡

PI 可以和细胞核 DNA 结合，但无法通过正常的细胞膜。当细胞死亡时细胞膜被破坏，PI 进入细胞内并与 DNA 结合，在荧光显微镜下呈红色荧光。对照组和处理组细胞中加入 10 μg/mL PI 染液，孵育 30 min 后在荧光显微镜下观察并记录细胞图像。

2.4 SA-β-Gal 活性检测细胞衰老

将 92-1 和 A375 细胞分别接种到ϕ35 培养皿中培养 24 h，用 10 Gy 重离子照射后继续培养 24、72 和 120 h，固定细胞并加入 SA-β-Gal 染色液，37℃条件下避光染色 24 h。光学显微镜下随机选取视野，统计至少 1000 个细胞并计算阳性染色细胞比例。

2.5 Western Blot 检测蛋白表达

RIPA 裂解液收集总蛋白，用 12%聚丙酰胺凝胶将蛋白进行电泳分离，将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜后用含 5%脱脂牛奶的 PBST 封闭 2 h，一抗在室温条件下孵育 2 h，二抗在室温条件下孵育 1 h，ECL 显色检测各蛋白的表达情况。利用 ImageJ 软件进行蛋白定量分析。

2.6 细胞因子抗体芯片和 ELISA 检测 GDF15 因子表达

细胞因子抗体芯片根据试剂盒的说明书操作: 玻片芯片室温下完全干燥后在每个芯片孔中加入 100 μL 封闭液，室温摇床上孵育 30 min，去除封闭液后每孔中加入 100 μL 离心过的培养基上清，4 ℃振荡过夜孵育。室温下加入荧光标记链霉亲和素孵育 1 h，洗涤后使用荧光扫描仪对玻片芯片扫描，并进行数据分析。ELISA 检测的基本步骤如下：将完成照射的细胞更换无血清培养基，对照组和处理组的细胞上清液按不同时间点采集，加入 GDF15 抗体孔板中进行孵育，加入 TMB 底物溶液进行显色反应，最后加入终止液，利用波长 450 nm 的多功能酶标仪对每个孔进行吸光度测量(OD450)。采用标准曲线计算 GDF15 浓度。

2.7 CCK-8 检测细胞增殖活力

96 孔板每孔接种 92-1 细胞 6000 个，48 h 后用含 ABT-263 的培养基处理，48 h 后加入反应液（终浓度为 10 μM）继续孵育 2 h，用多功能酶标仪测量波长 450 nm 的吸光度值。细胞相对活力=OD450（ABT-263 处理组）/OD450（未处理组）。

2.8 Annexin V-PI 双染检测细胞凋亡

收集处理后的细胞在 100 μL 缓冲液、2 μL Annexin V-FITC 染液、2μ L PI 染液中室温避光染色 30 min，用流式细胞仪至少采集 10000 个单细胞进行分析，定义活细胞：Annexin V 阴性/PI 阴性；坏死细胞：Annexin V 阴性/PI 阳性；早期凋亡细胞：Annexin V 阳性/PI 阴性；晚期凋亡细胞：Annexin V 阳性/PI 阳性。利用 IDEAS 6.0 软件处理所得数据。

2.9　统计学分析

所有实验均独立重复最少 3 次，数据以平均值±标准误差（$\bar{x}$±SD）表示。绘图软件使用 OriginPro 2021，数据分析使用 Excel，用 t 检验进行差异分析，*$P < 0.05$ 视为统计学上有显著差异。

3　结果

3.1　经重离子照射的黑色素瘤细胞呈现典型的衰老表型

对两种黑色素瘤 92-1 和 A375 细胞照射 10 Gy 碳离子后进行 PI 染色，发现在照射后的 120 h 两种黑色素瘤细胞的死细胞比率分别为(7.71±1.89)%和(10.24±1.96)%（图 2（a）），照射组大部分的细胞在形态学上表现为单个细胞体积增大且呈扁平状，并伴有广泛的空泡化，同时 SA-β-Gal 染色阳性细胞（蓝绿色）明显增加，呈现典型的衰老细胞表型（图 2（b））。通过统计照射后 SA-β-Gal 染色阳性细胞的比率（图 2（c）和（d）），发现阳性细胞比率随照射后时间的增加而上升，至 120 h 时 A375 和 92-1 细胞的衰老细胞比率分别超过了 80%和 60%。以上这些结果表明碳离子照射并没有引起黑色素瘤 A375 和 92-1 细胞发生大量的死亡，而是诱导受照射细胞发生了衰老。

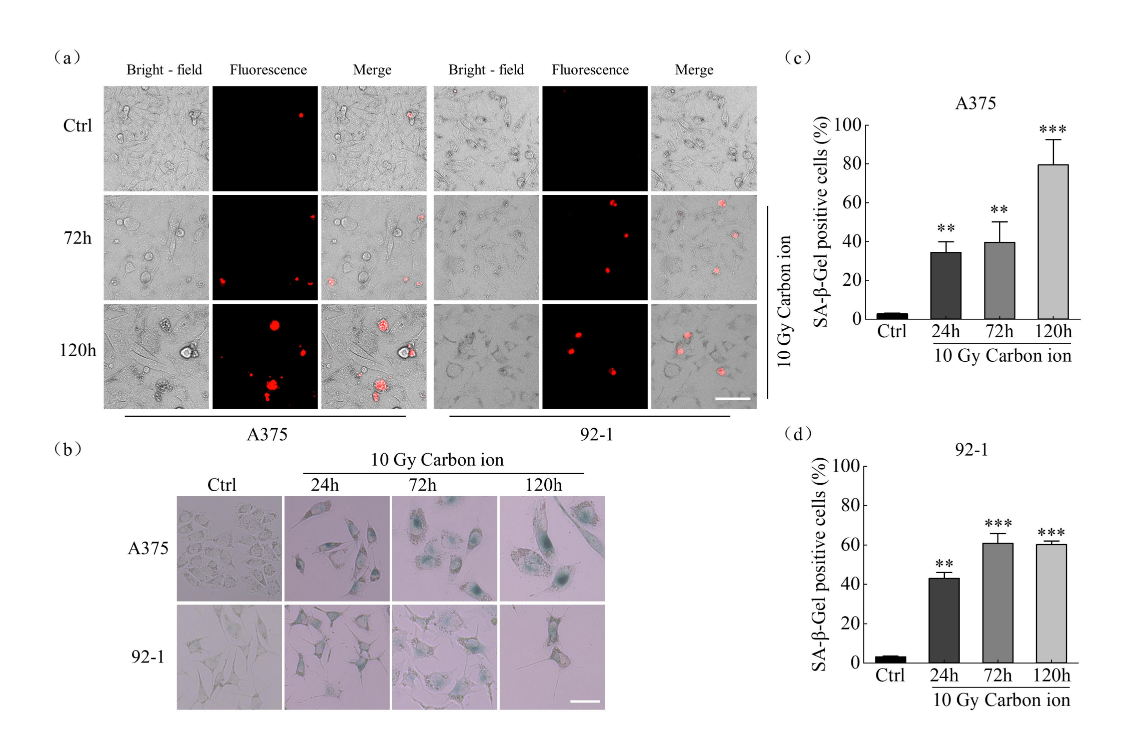


图 2　经碳离子照射的黑色素瘤细胞呈现典型的衰老细胞表型

(a) 未照射的 A375 和 92-1 对照细胞（Ctrl）及 10 Gy 碳离子照射后两种黑色素瘤细胞的 PI 染色（红色）结果，比例尺：100 μm；

（b）10 Gy 碳离子照射后 24、72 和 120 h 两种黑色素瘤细胞的 SA-β-Gal 染色结果，比例尺：50 μm；（c-d）10 Gy 碳离子照射 A375（c）和 92-1（d）后 24、72 和 120 h 的 SA-β-Gal 染色阳性细胞统计结果，*P<0.05，***P<0.001（Carbon ion Vs Ctrl）

3.2 重离子照射诱导黑色素瘤细胞衰老相关分泌表型

细胞衰老的另一个典型特征是分泌大量细胞因子形成 SASP。利用细胞因子抗体芯片检测经碳离子和 X 射线照射后的细胞上清液，结果显示，碳离子照射组和 X 射线组 SASP 表达谱具有一定差异，其中的 GDF15 分泌水平显著提高，而 X 射线照射组 SASP 中的 GDF15 分泌水平也有提高，但不如碳离子照射的结果明显（图 3（a）和（b））。此外，TIMP2、sFRP1、Progranulin 等因子在碳离子照射后也有上调，但在 X 射线照射后基本没有变化。

进一步利用 ELISA 检测重离子和 X 射线诱导 92-1 细胞 GDF15 的表达水平随时间的变化趋势，结果如图 3（c）所示，可以看出 10 Gy 的碳离子或 X 射线照射后 GDF15 表达水平比对照组明显升高，但 X 射线照射组的上升趋势不如碳离子照射组显著。而 GDF15 的蛋白水平检测结果也显示，碳离子辐照后 92-1 细胞内 GDF15 蛋白表达水平随照射后时间的延长而增加（图 3（d））。以上结果表明，重离子和 X 射线诱导的黑色素瘤细胞 SASP 谱具有一定的差异性，其中 GDF15 在重离子照射后具有更强的表达量和分泌量，可以作为重离子诱导黑色素瘤细胞发生衰老的特征标志物。

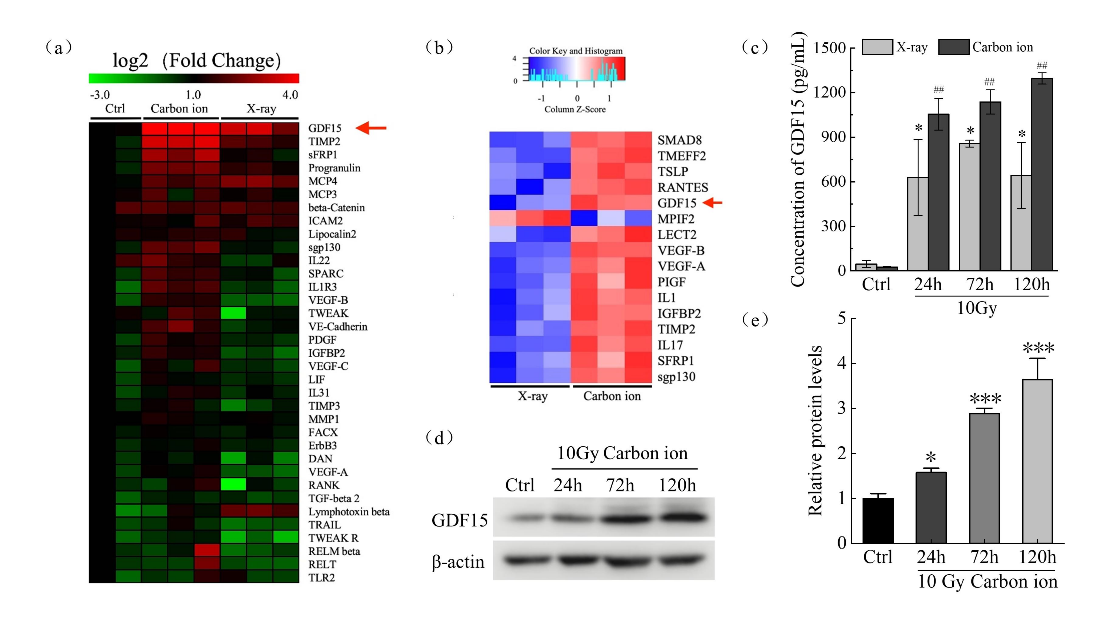


图 3　碳离子及 X 射线照射后黑色素瘤细胞衰老相关分泌表型及 GDF15 表达情况

（a-b）碳离子及 X 射线照射后黑色素瘤 92-1 细胞 SASP 因子的表达量热图（a）及碳离子和 X 射线的 SASP 谱对比（b），Ctrl 为未照射的对照组，红色箭头指示 GDF15；（c）碳离子照射后 92-1 细胞外分泌的 GDF15 水平，*P<0.05，**P<0.01（X-ray Vs Ctrl），#P<0.05，###P<0.001（Carbon ion Vs Ctrl）；（d-e）碳离子照射后不同时间点黑色素瘤 92-1 细胞内 GDF15 表达水平及其灰度值，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001（Carbon ion Vs Ctrl）

3.3　重离子照射诱导细胞衰老与 p53/p21 激活有关

已有的研究表明具有抑癌活性的 p53 基因与细胞衰老密切相关：辐射引起的 DNA 损伤激活 p53 及其下游的 p21，通过 CDK-Cyclin 复合物抑制 pRB 蛋白的磷酸化，使细胞发生长期周期阻滞，因此 p53/p21 激活是细胞衰老的关键标志[18]。通过检测经 10 Gy 碳离子照射的 A375 和 92-1 细胞的 p53、p21 蛋白水平的变化，可以看出未照射组中两种蛋白表达量极低，而碳离子照射组中的 p53 蛋白随时间累积并引起下游的 p21 蛋白表达升高，如图 4 所示，结合前面的结果，可以得出以下结论：两种黑色素瘤细胞在受到碳离子照射后都发生了以细胞周期阻滞为主要特征的细胞衰老。

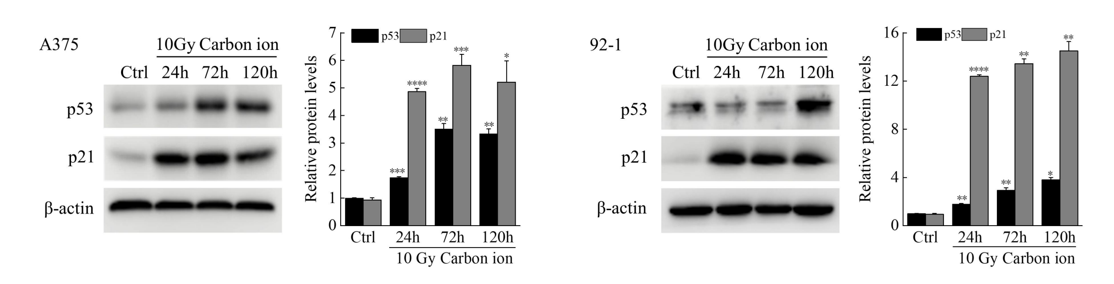


图 4　碳离子照射激活 p53、p21 蛋白表达

两种黑色素瘤细胞辐照后 p53、p21 蛋白表达及其对应的灰度值，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001（Carbon ion Vs Ctrl）

3.4　ABT-263 对重离子辐射诱导的黑色素瘤细胞衰老的清除作用

如引言所述，ABT-263 主要通过诱导细胞凋亡清除肿瘤细胞。为了确定 ABT-263 在黑色素瘤细胞中的适宜工作浓度，将指数增殖期的 92-1 细胞经不同浓度 ABT-263 处理，48 h 后利用 CCK-8 法检测细胞活力，结果如图 5（a）所示，在选择的 0.125、0.25、0.5、1、2.5、5 μM 浓度范围内，ABT-263 对细胞活力没有显著影响，表明 ABT-263 的细胞毒性较小。

X 射线照射 92-1 细胞后以 0、0.125、0.25、0.5 μM 的 ABT-263 处理 48 h，用流式细胞术检测细胞凋亡，获得的未照射组（0 Gy）、照射后立即加入 ABT-263 处理组（10Gy-48h），照射后 72 h 再加入 ABT-263 处理组（10Gy-72h-48h）的细胞凋亡分布如图 5（b）所示，统计结果如图 5（c）所示，可以看出，ABT-263 处理可以明显提高凋亡细胞比率，并且随着 ABT-263 浓度增加，凋亡细胞比率逐渐上升。碳离子照射 92-1 细胞后不同时间点加入 0.5 μM 的 ABT-263 处理 48 h 后的细胞凋亡分布如图 5（d）所示，辐照后立即加入 ABT-263 处理组的总凋亡比例近 58%，辐照后 72 h 再加入 ABT-263 处理组（10Gy-72h-48h）的总凋亡比例超过 70%。以上这些结果提示 ABT-263 对辐照引起的衰老肿瘤细胞具有良好的促凋亡作用。

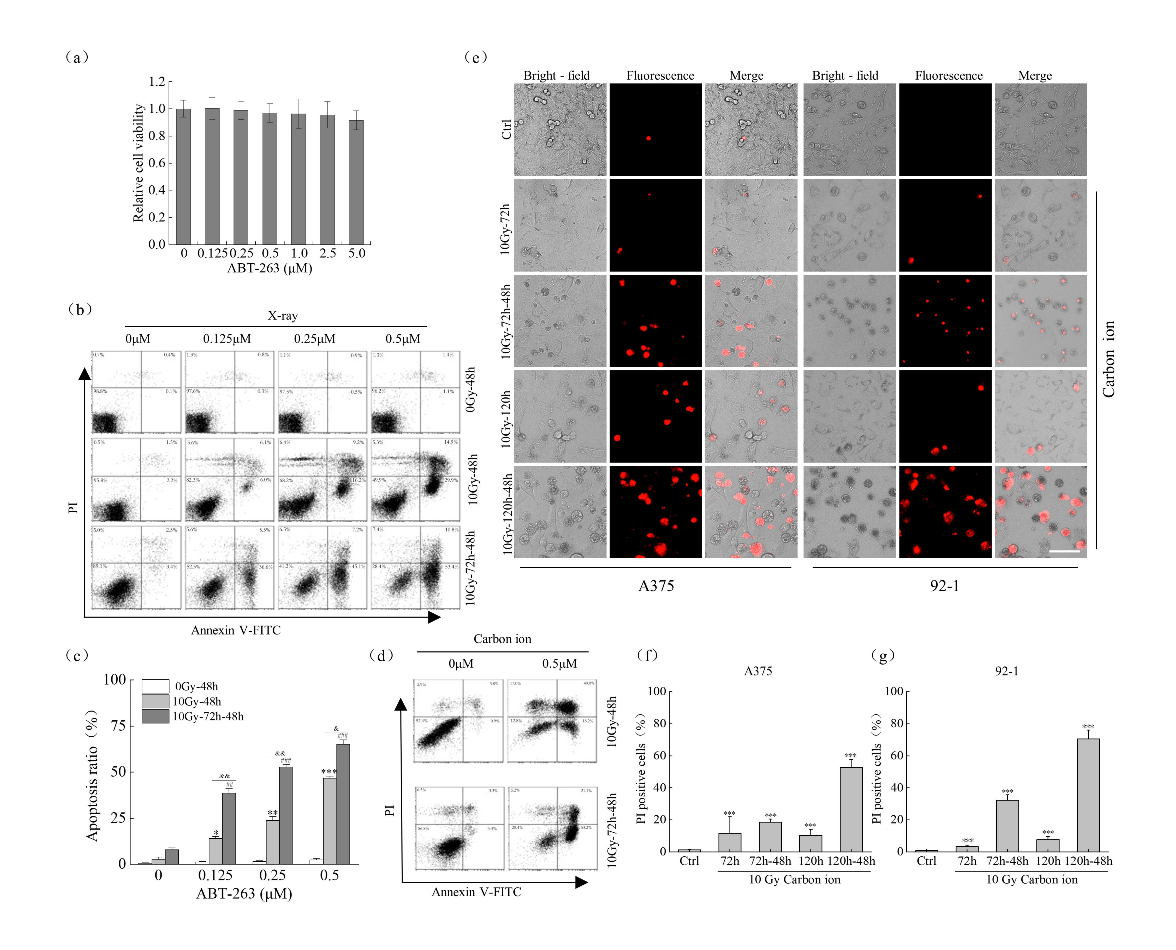


图 5　ABT-263 对碳离子辐射诱导的黑色素瘤细胞衰老的清除作用

(a) 不同浓度 ABT-263 对 92-1 细胞活力的影响；(b-c) 92-1 细胞分别经不同浓度 ABT-263（0Gy-48h）、X 射线照射（10Gy-48h）及 X 射线照射 72 h 后给予 0.5 μM ABT-263 处理 48 h（10Gy-72h-48h）后流式细胞术检测细胞凋亡（b），并统计细胞凋亡（早凋+晚凋）比率，*P<0.05，**P<0.01（10Gy-48h 处理组 Vs 0Gy-48h 处理组），##P<0.01，###P<0.001（10Gy-72h-48h 处理组 Vs 0Gy-48h 处理组），&P<0.05，&&&P<0.001（10Gy-72h-48h 处理组 Vs 10Gy-48h 处理组）；（d）92-1 细胞经 10 Gy 碳离子照射后即刻给与 0 或 0.5 μM 的 ABT-263 处理 48 h（10Gy-48h）、或在照射后 72 h 再给与 ABT-263 处理 48 h（10Gy-72h-48h），通过流式细胞术检测细胞凋亡；(e-g) 各种处理后两种黑色素瘤细胞的 PI 染色（红色）结果与统计结果，比例尺：100μm，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001（Carbon ion Vs Ctrl）

最后，通过 PI 染色检测未照射组（Ctrl）、10 Gy 照射组和 10 Gy 照射联合 ABT-263 处理组的 A375 和 92-1 细胞，在荧光显微镜下观察死亡细胞，发现照射组和照射联合 ABT-263 处理组均可见大小不等的圆形红色荧光小体。A375 细胞在 10 Gy 碳离子照射后分别于 72 和 120 h 加入 ABT-263 处理 48 h（10Gy-72h-48h 和 10Gy-120h-48h），细胞死亡率分别为(18.63±3.87)%和(52.79±4.89)%；92-1 细胞在 10 Gy 碳离子照射后分别于 72 和 120 h 加入 ABT-263 处理 48 h，细胞死亡率分别为(32.31±3.28)%和(70.53±5.51)%，比同时间点仅照射处理的细胞死亡率有明显提高，表明 ABT-263 能有效促进碳离子辐射诱导的衰老细胞死亡，

清除黑色素瘤细胞衰老的作用非常明显。

4 讨论

放疗导致的肿瘤细胞衰老与电离辐射引起的严重的DNA双链损伤及长期细胞周期阻滞密切相关，能够显著抑制肿瘤细胞增殖以及肿瘤进一步发展[23-24]。另一方面，放疗后衰老细胞的积累可能通过激活cGAS-STING信号通路分泌多种类型胞外因子[25-26], 形成SASP表型，并通过改变肿瘤微环境对肿瘤的复发和转移产生影响[27]。因此，如何利用衰老细胞清除剂降低衰老细胞对机体的负面影响也成为当前的研究热点，方法包括促进衰老细胞死亡、调节SASP成分或防止细胞衰老[28-29]。由于BCL-2家族在衰老细胞中表达上升[30]，可以利用抑制抗凋亡蛋白的药物特异性地清除衰老细胞[31]。有研究证明ABT-263通过阻断BCL-2和BCL-xL与凋亡前体蛋白的相互作用，抑制抗凋亡信号以促进衰老细胞的清除，在动物模型中恢复造血干细胞的功能，提示利用ABT-263靶向诱导衰老细胞发生死亡可以作为提高肿瘤放疗效果的辅助治疗手段[32-33]。相比其他已报道的衰老细胞清除方法（如免疫系统识别或化学药物作用），ABT-263可能通过多种机制发挥作用，可能通过调控衰老细胞的细胞周期，促使进入凋亡途径；也可能通过调节衰老相关分泌表型（SASP）因子的分泌，改善肿瘤微环境，减轻炎症反应，并增强免疫监视功能[34]；ABT-263在放疗后可能通过影响免疫微环境中的细胞凋亡，进一步调控免疫细胞的活化状态和功能，从而影响衰老细胞的存活。这些潜在机制表明，ABT-263的作用不仅限于其促凋亡效应，还可能在免疫微环境调节、细胞修复及肿瘤发生等方面提供新的研究方向，需要进一步开展多角度的深入探索和验证。本研究已证实ABT-263能够有效促进衰老的肿瘤细胞进入凋亡，为利用ABT-263清除重离子辐射诱导的衰老肿瘤细胞提供了数据支持。

重离子辐射的高传能线密度、高生物学效应能使肿瘤细胞产生难以修复的DNA团簇损伤，在诱导肿瘤细胞衰老方面也更加有效。我们的实验结果表明，10 Gy碳离子束照射导致黑色素瘤细胞出现衰老相关β-半乳糖苷酶活性升高、参与细胞周期调控的p53/p21蛋白高表达、伴随SASP及GDF15因子水平上调等现象，标志着黑色素瘤细胞已经进入了衰老状态。值得一提的是，在SASP的众多成分中，GDF15作为TGF-β超家族的成分在生理状态下表现出多功能性，其在体内一般持续低表达以维持机体平衡，但在细胞衰老、炎症、组织损伤或肿瘤发生等应激条件下表达量会急剧上升，以发挥其在代谢调控和炎症反应中的作用，例如通过与其特异性受体GFRAL结合，促进脂肪酸的β氧化和脂质分解，帮助缓解代谢性疾病[35-36]。最新研究表明，GDF15在多种衰老模型中广泛上调[37]，GDF15的表达升高在衰老

过程中作为标志物存在，可作为衰老组织的修复能力的指征[38-39]；另外，GDF15 不仅能够反映衰老相关的免疫功能下降和代谢紊乱，还可能通过调节组织修复能力和免疫逃逸机制，参与衰老过程中的多层次调控[37, 40]。我们的实验结果也证明了 GDF15 在辐射诱导细胞衰老条件下表达水平显著升高，将其与其他生物标志物联合使用可以提高衰老监测和衰老相关疾病预警的准确性。另外，GDF15 可能会根据肿瘤细胞类型的不同发挥抑癌和促癌的双重作用[41]，研究 GDF15 调节肿瘤细胞辐射抵抗的生理功能，探讨其是基于何种相关信号通路发挥作用的分子机制是我们正在关注的科学问题。作为一种新兴的衰老标志物，深入研究 GDF15 也有助于丰富衰老细胞及 SASP 因子介导肿瘤放疗抵抗的分子机制网络，也有望为肿瘤放疗增敏提供新的潜在靶点和理论依据。

综上所述，重离子辐射诱导肿瘤细胞衰老是一种有效的抑癌机制。但由于衰老细胞的积累会产生衰老相关分泌表型，可能改变肿瘤微环境带来肿瘤复发和转移的潜在风险。为了进一步确保放射治疗效果，可以利用 ABT-263 促进衰老的肿瘤细胞进入凋亡，以达到清除衰老细胞的目的。这些研究结果为临床上将放化疗和衰老细胞清除剂联合起来的治疗方案提供了新思路，但仍需对其在不同肿瘤类型中的安全性和有效性开展进一步的评估[42-43]。

致谢

感谢兰州重离子研究装置（HIRFL）全体工作人员为碳离子照射实验提供优质束流，感谢近代物理研究所公共技术服务中心徐丹老师和吴庆丰老师为测试仪器的使用提供热心指导和帮助。

参考文献（References）

[1] GUO W, WANG H, Li C. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 424. doi:10.1038/s41392-021-00827-6.
[2] Li P, Liu X, Zhao T, *et al*. Cell Death Discov, 2021, 7(1):184. doi: 10.1038/s41420-021-00570-5.
[3] COPPE J P, DESPREZ P Y, KRTOLICA A. *et al*. Annu Rev Pathol, 2010, 5(1): 99–118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
[4] TAKASUGI M, YOSHIDA Y, OHTANI N. Mol Oncol, 2022, 16(18):3333-3351. doi: 10.1002/1878-0261.13268.
[5] CONTE M, GIULIANI C, CHIARIELLO A, *et al*. Ageing Res Rev, 2022, 75:101569. doi: 10.1016/j.arr.2022.101569.
[6] SCHIEGNITZ E, KAMMERER P W, RODE K, *et al*. J Oral Pathol Med, 2016, 45(1):63-69. doi: 10.1111/jop.12323.
[7] PARK H, NAM K S, LEE H J, *et al*. Front Oncol, 2022, 12:801230. doi: 10.3389/fonc.2022.801230.
[8] LI Y L, CHANG J T, LEE L Y, *et al*. Oncotarget, 2017, 8(1):1508-1528. doi: 10.18632/oncotarget.13649.
[9] ZHAO X, LIU X, HU S, *et al*. Int J Mol Sci, 2022, 23(18):10911. doi: 10.3390/ijms231810911.
[10] OU H, HOFFMANN R, GONZÁLEZ-LÓPEZ C, *et al*. Mol Oncol, 2021, 15(10):2634. doi: 10.1002/1878-0261.12807.

[11] MEHDIZADEH M, AGUILAR M, THORIN E, *et al*. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(4):250. doi: 10.1038/s41569-021-00624-2.
[12] KIRKLAND J L, TCHKONIA T. J Intern Med, 2020, 288(5):518. doi: 10.1111/joim.13141.
[13] ZHANG X, YE C, SUN F, *et al*. PLoS One, 2016, 11(5):e0155725. doi: 10.1371/journal.pone.0155725.
[14] COOLEY J C, JAVKHLAN N, WILSON J A, *et al*. JCI Insight, 2023, 8(3):e163762. doi: 10.1172/jci.insight.163762.
[15] CHEN Q, SONG S, WEI S, *et al*. Oncotarget, 2015, 6(28):25883. doi: 10.18632/oncotarget.4540.
[16] KAKKOLA L, DENISOVA O V, TYNELL J, *et al*. Cell Death Dis, 2013, 4(7):e742. doi: 10.1038/cddis.2013.267.
[17] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(10):732. doi: 10.1038/s41580-023-00629-4.
[18] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, *et al*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2):75. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.
[19] LIN Q, QUE F, GU C, *et al*. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(12):1632. doi: 10.1038/aps.2017.78.
[20] AIRIAU K, PROUZET-MAULEON V, ROUSSEAU B, *et al*. Oncotarget, 2016, 7(1):845. doi: 10.18632/oncotarget.6417.
[21] TOLCHER A W, LORUSSO P, ARZT J, *et al*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015, 76(5):1025. doi: 10.1007/s00280-015-2883-8.
[22] LONG Kaiqin, HE Jingpeng, ZHANG Tongshan, *et al*. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2019, 37(6):26. doi:10.11889/j.1000-3436.2019.rrj.37.060302 (in Chinese).
(龙凯琴, 何进鹏, 张通珊, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2019, 37(6):26. doi:10.11889/j.1000-3436.2019.rrj.37.060302)
[23] XIAO S, QIN D, HOU X, *et al*. Front Oncol, 2023, 13:1189015. doi: 10.3389/fonc.2023.1189015.
[24] SHARMA A, ALMASAN A. Adv Cancer Res, 2021, 150:249-284. doi: 10.1016/bs.acr.2021.01.006.
[25] VICTORELLI S, SALMONOWICZ H, CHAPMAN J, *et al*. Nature, 2023, 622(7983):627-636. doi: 10.1038/s41586-023-06621-4.
[26] ZHANG D, LIU Y, ZHU Y, *et al*. Nat Cell Biol, 2022, 24(5):766. doi: 10.1038/s41556-022-00894-z.
[27] CHIBAYA L, SNYDER J, RUSCETTI M. Semin Cancer Biol, 2022, 86(3):827-845. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.02.005.
[28] LAFONTAINE J, CARDIN G B, MALAQUIN N, *et al*. Cancers (Basel), 2021, 13(3):386. doi: 10.3390/cancers13030386.
[29] GREEN D R. Cell, 2019, 177(5): 1094. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.024.
[30] BARRIUSO D, ALWAREZ-FRUTOS L, GONZALEZ-GUTIERREZ L, *et al*. Int J Mol Sci, 2023, 24(7):6374. doi: 10.3390/ijms24076374.
[31] ZHU Y, TCHKONIA T, PIRTSKHALAVA T, *et al*. Aging Cell, 2015, 14(4):644. doi: 10.1111/acel.12344.
[32] CHANG J, WANG Y, SHAO L, *et al*. Nat Med, 2016, 22(1):78. doi: 10.1038/nm.4010.
[33] KIRKLAND J L, TCHKONIA T. EBioMedicine, 2017, 21:21-28. doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.013
[34] AIMONO Y, ENDO K, SEKIYA I. Aging Cell, 2024, e14385. doi: 10.1111/acel.14385.
[35] DU Y, MA Y, ZHU Q, *et al*. Front Med, 2023, 17(1):119. doi: 10.1007/s11684-022-0949-7.
[36] MELVIN A, CHANTZICHRISTOS D, KYLE C J, *et al*. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(5):1427. doi: 10.1210/clinem/dgz277.
[37] SIDDIQUI J A, POTHURAJU R, KHAN P, *et al.* Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 64:71-83. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.11.002.
[38] LIU H, HUANG Y, LYU Y, *et a*l. Exp Gerontol, 2021, 146:111228. doi: 10.1016/j.exger.2021.111228.

[39] FUJITA Y, TANIGUCHI Y, SHINKAI S, *et al*. Geriatr Gerontol Int, 2016, 16(1):17-29. doi: 10.1111/ggi.12724.
[40] ROCHETTE L, MELOUX A, ZELLER M, *et al*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(8):165798. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165798.
[41] TARFIEI G A, SHADBOORETAN A, MONTAZERI H, *et al*. Cell Biochem Funct, 2019, 37(5):320-330. doi: 10.1002/cbf.3391.
[42] GANDHI L, CAMIDGE D R, RIBEIRO DE OLIVEIRA M, *et al*. J Clin Oncol, 2011, 29(7):909. doi: 10.1200/JCO.2010.31.6208.
[43] RUDIN C M, HANN C L, GARON E B, *et al*. Clin Cancer Res, 2012, 18(11):3163. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.

Cellular senescence induced by heavy ion radiation and its clearance by senolytic ABT-263

ZHANG Tongshan[1,2], ZHAO Yanfei[3], HUA Junrui[1], HE Jinpeng[1,2#], WANG Jufang[1,2#]

(*1.Key Laboratory of Space Radiobiology of Gansu Province, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou730000, China)

Abstract: The biological effects of heavy ion radiation-induced senescence in melanoma cells and the clearing effects of ABT-263 on senescent cells were investigated with two melanoma A375 and 92-1 cells after carbon ion radiation which was provided by the Heavy Ion Research Facility in Lanzhou (HIRFL). Cell senescence and apoptosis were detected by senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry. Cell viability was measured by CCK-8, and the cell death level was detected by propidium iodide (PI) staining after radiation. The results showed that, at 120 h after 10 Gy carbon ion irradiation, the cell death rate did not exceed 10%, while over 80% of A375 cells and 60% of 92-1 cells showed typical senescence phenotypes, such as obvious expansion, flattening and senescence-associated β-galactosidase positivity, accompanying by asenescence-associated secretory phenotype and significantly increased GDF15 levels. ABT-263 treatment significantly induced apoptosis of senescent cells, and the proportion of dead cells at 120 h after radiation increased to 53% and 71% for A375 and 92-1 cells respectively. These results further clarify the senescence effect induced by heavy ion radiation on melanoma cells and highlight the potential of

ABT-263 to promote senescent cells into apoptosis and eliminate the senescent cells.

Key words: Heavy ions; Senescence; ABT-263; Apoptosis; GDF15

Received date：yyyy-mm-dd；**Revised date:**：yyyy-mm-dd

Foundation item：National Natural Science Foundation of China (12175289, 12375355); Science and Technology Research Project of Gansu Province (20JR5RA555, 145RTSA012, 24JRRA952); the Youth Innovation Promotion Association CAS (2021415)

First author：ZHANG Tongshan(1996-), male, a graduate student at the University of Chinese Academy of Sciences, majoring in biophysics. E-mail: zhangtongshan@impcas.ac.cn

Corresponding authors：HE Jinpeng, E-mail: hejp03@impcas.ac.cn; WANG Jufang, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn